

校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720081152533

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

具有安莎产生潜能放线菌的筛选及小单孢
菌中安莎基因簇的克隆

Screening of Potential Ansamycin-producing Actinomycets
and Cloning of Ansamycin Biosynthetic Gene Clusters from
Micromonospora

葛 玲

指导教师姓名: 沈 月 毛 教 授

王 浩 鑫 讲 师

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2011 年 04 月

论文答辩时间: 2011 年 06 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 04 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其它个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
缩略词对照表	IV
第一章 前言	1
1. 小单孢菌次级代谢产物研究进展	1
1.1. 小单孢菌的分布及分离	1
1.2. 小单孢菌中的活性物质	2
1.3. 小单孢菌中的安莎类抗生素	4
2. 安莎类抗生素简介	5
2.1. 安莎霉素的分类及生理活性.....	5
2.2. 安莎类抗生素的生物合成概述.....	10
2.3. AHBA 合酶基因在寻找新的安莎霉素抗生素中的应用	13
3. 酰胺合酶 (amide synthase)概述.....	14
4. 本论文研究的目的、意义与内容	16
第二章 材料与方法	18
1. 材料	18
1.1. 菌株.....	18
1.2. 酰胺合酶基因.....	18
1.3. 常用质粒.....	18
1.4. 工具酶.....	18
1.5. 培养基配方.....	18
1.6. 常用试剂配方、抗生素.....	19
1.7. 引物合成.....	21
1.8. 分析软件.....	21
1.9. 主要仪器.....	22

2. 实验方法	22
2.1. AHBA 合酶基因阳性菌株的筛选	23
2.2. AHBA 阳性菌株 Fosmid 文库的构建，安莎合成基因簇的克隆	25
2.3. 随机亚克隆序列补充拼接数据.....	31
2.4. 安莎基因簇的分析.....	34
2.5. 酰胺合酶的异源表达与体外活性.....	34
第三章 结果与分析	39
1. 350 株放线菌的 AHBA 合酶基因 PCR 筛选及阳性菌株的菌种鉴定	39
1.1. AHBA 合酶基因的 PCR 筛选及阳性菌株的菌种鉴定.....	39
1.2. AHBA 合酶基因的系统学分析	41
2. AHBA 合酶基因阳性菌株 Fosmid 文库的构建，安莎合成基因簇的克隆	42
2.1. AHBA 合酶基因阳性菌株 Fosmid 文库的构建	43
2.2. Fosmid 文库的评价及感染细胞的阵列保存.....	44
2.3. Fosmid 文库中安莎基因簇的克隆.....	45
3. 几株小单孢菌中可能的安莎基因簇	50
3.1. 序列的开放阅读框（ORF）预测.....	51
3.2. AHBA 合成相关基因的分析	58
3.3. PKS 基因分析对应产物骨架预测	59
3.4. AHBA 合酶基因阳性菌株产安莎的潜力分析	62
3.5. 基因簇中的调控基因、抗性基因与后修饰基因.....	62
4. 酰胺合酶的可溶性分析与活性实验	63
4.1. 酰胺合酶表达载体的构建.....	63
4.2. 酰胺合酶可溶性表达条件优化.....	64
4.3. 酰胺合酶活性初探.....	66
第四章 讨论与结论	68
1. 从放线菌菌种库中 PCR 筛选 AHBA 合酶基因阳性菌株	68
2. Fosmid 基因组文库的构建及安莎合成基因簇的筛选.....	70
3. AHBA 合酶基因阳性菌株安莎基因簇的分析.....	70
4. 酰胺合酶的可溶性表达和体外活性	71

第五章 结论与展望	73
参考文献	74
致谢.....	83
附录.....	84
附录 I .Fosmid 文库筛选过程中的引物序列.....	84
附录 II .酰胺合酶基因序列	85
附录III.基因簇的 ORF 预测结果.....	86

Catalogue

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Abbreviations	IV
Chapter1 Introduction	1
1. Research development of natural products from <i>Micromonospora</i>	1
1.1. Distribution and isolation of <i>Micromonospora</i>	1
1.2. Active substances from <i>Micromonospora</i>	2
1.3. Ansamycins from <i>Micromonospora</i>	4
2. Introduction of ansamycins.....	5
2.1. Classification and physiological activities of ansamycins.....	5
2.2. Overview of biosynthesis of ansamycins.....	10
2.3. Applications of AHBA synthase gene in looking for new ansamycins..	13
3. Overview of amide synthase.....	14
4. Purpose,significance and content of this study.....	16
Chapter 2 Materials and Methods	18
1. Materials	18
1.1. Strains	18
1.2. Amide synthase gene	18
1.3. Common plasmids	18
1.4. Tool enzymes	18
1.5. Formula of medium.....	18
1.6. Formula of reagents and antibiotics.....	19
1.7. Synthesis of primers.....	21
1.8. Software of analysis.....	21
1.9. Main apparatus.....	22
2. Methods.....	22

2.1. Screening of AHBA synthase gene postive strains.....	23
2.2.Construction of fosmid libruries of postive strains, screening of ansamycin gene clusters.....	25
2.3. Supply splicing date for sequences through random sub-clonies	31
2.4. Analysis of ansamycin gene clusters	34
2.5. Expression and in vitro activity experiments of amide synthase.....	34
Chapter 3 Results and Analysis	39
1. PCR screening of 350 actinomycete strains according to AHBA synthase gene and identification of postive strains.....	39
1.1. PCR screening of actinomycetes according to AHBA synthase gene and identification of postive strains.....	39
1.2. Systematics analysis of AHBA synthase gene.....	41
2. Construction of Fosmid libruries of postive strains and cloning of ansamycin gene clusters	42
2.1. Construction of Fosmid libruries of AHBA synthase gene postive strains.....	43
2.2.Evaluation of Fosmid libruries and array preservation of infected cells	44
2.3. Cloning of ansamycin gene clusters from Fosmid libruries.....	45
3. Probable ansamycin gene cluster in <i>Micromonospora</i>.....	50
3.1. Prediction of open reading frame in sequence.....	51
3.2. Analysis of genes associated with AHBA	58
3.3. Prediction of natrual product skeleton according to PKS gene	59
3.4. Potential ansamycin-producing analysis of AHBA synthase gene positive strains.....	62
3.5.Regulatory genes, resistance genes , post modification genes in clusters	62
4. Soluble analysis and active experiment of amide synthase	63
4.1. Construction of expression vector about amide synthase.....	63
4.2. Optimization of soluble expression conditions of amide synthase.....	64
4.3. Preliminary inquiry into activity of amide synthase.....	66

Chapter4 Discussion and Conclusions	68
1. Screening of AHBA synthase gene postive strains from preserved actinomycetes.....	68
2. Construction of Fosmid libruries and screening of ansamycin gene clusters from Fosmid libruries.....	70
3. Analysis of ansamycin gene clusters in AHBA synthase gene postive strains.....	70
4. Soluble expression and in vitro activity experiments of amide synthase...	71
Chapter 5 Conclusion and Prospect.....	73
References	74
Acknowledgements	83
Appendix.....	84
Appendix I . Primers used in screening of Fosmid libruries	84
Appendix II . Sequence of amide synthase gene.....	85
AppendixIII. Prediction of ORF in sequence.....	86

摘要

安莎类抗生素是一类主要由放线菌产生的, 结构独特、具有广泛生理活性的 I 型聚酮类大环内酰胺。其生物合成起始单元是 3-氨基-5-羟基苯甲酸 (3-amino-5-hydroxybenzoic acid, AHBA)。AHBA 通过莽草酸途径的分支途径氨基莽草酸途径合成, 其中催化最后一步反应的 AHBA 合酶基因有较高的保守性和特异性, 很早就被用作探针筛选安莎霉素的生物合成基因簇。为了寻找新安莎类抗生素, 本研究以 AHBA 合酶基因为筛选目标, 通过多轮 PCR 并反复验证, 从 350 株放线菌(主要是小单孢菌)中筛选到 10 株 AHBA 合酶基因阳性菌株, 经过 16S rDNA 鉴定, 全部为小单孢菌。

选取 AHBA 合酶基因分歧较大的 NS0172, NS0208, FXY411, FXYA29, HK160111 分别构建 Fosmid 基因组文库, 以 AHBA 合酶基因为探针筛选 Fosmid 文库, 通过步移筛选, 从每个文库中得到几个可能与安莎霉素合成相关的重叠克隆。通过 454 高通量测序对阳性 fosmid 进行测序, 结合随机亚克隆测序结果进行拼接, 得到 5 个基因簇序列; 运用生物信息学的手段对基因簇序列进行了开放阅读框的预测和功能推测, 发现 5 个基因簇中都含有 AHBA 合成相关基因、PKS 基因。其中 NS0172 菌株中的基因簇 Nam 以及 HK160111 中的基因簇 Ham 含有 AHBA 合成所需所有基因, 完整的 PKS 基因和酰胺合酶基因, 初步推断这两个基因簇合成 5 酮安莎霉素。另外三个基因簇都不完整, 但相互之间相似性很高, 且与 *Micromonospora* sp. L5 中的一个基因簇非常相似, 很可能合成同类化合物。

为了研究酰胺合酶的体外功能, 我们还将两个不同基因簇来源的酰胺合酶基因 *natF* 和 *tam15* 在大肠杆菌中进行了异源表达。通过表达条件优化, 获得了可溶性蛋白, 为研究酰胺合酶结构与功能的关系、探究酰胺合酶催化聚酮链的释放和酰胺键形成机理奠定了基础。

通过基因水平的筛选获得潜在的安莎霉素产生菌, 结合高通量测序技术, 可以快速高通量地获得潜在的安莎霉素合成基因簇, 根据序列推测所编码化合物的新颖性, 为进一步发现新安莎霉素提供指导, 同时也能为安莎霉素的组合生物合成提供素材。

关键词: 安莎霉素; AHBA 合酶; 酰胺合酶

Abstract

Ansamycins is a family of macrolactam antibiotics with characteristic structure and potent physiological activity, which often was isolated from actinomycetes. The biosynthesis of all ansamycins began with a aminoshikimate pathway derived starter unit, 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA). AHBA synthase, catalyzing the last step of AHBA formation, generally be chosen as anchor gene to clone the ansamycin biosynthetic gene clusters. For discovering new ansamycins antibiotics, this study targeting AHBA synthase gene by two rounds of PCR and reconfirmation. Ten AHBA synthase gene positive isolates, all assigned as micromonospora by 16S rDNA, were recovered from 350 actinomycetes (mainly micromonospora).

Five isolates, NS0172, NS0208, FXY411, FXYA29 and HK160111, were choosen for isolation of putative ansamycin biosynthetic gene clusters. Fosmid libraries was constructed and screened by AHBA synthase gene probe. After stepwise walking screening, five contigs were reconstructed. Each contig was comprised of several overlapping colonies, which were sequenced by 454 pyrosequencing and sanger method. The sequences of putative ansamycin gene cluster were subjected to ORF prediction and function assignment. All of five gene clusters contains AHBA synthesis-related genes and polyketide synthase (PKS) genes. Two of five gene clusters, *nam* (from NS0172) and *ham* (from HK160111), also contains amide synthase apart from completed PKS genes, which indicated the potential to produce ansamycins. Pentaketides were deduced from the PKS gene. Gene clusters of other 3 strains were all incomplete, and significant similarities were shared among them and with a large PKS gene cluster distinguished from *Micromonospora* sp. L5.

In order to investigate the function of amide synthase *in vitro*, we heterologously expressed two amide synthases genes *natF* (from a naphthamycin gene cluster) and *tam15* (from a ansamycin gene cluster isolated from metagenomic library of *Trewia nudiflora*) in *E. coli*. Through optimization of expression conditions, soluble protein was obtained, which set the stage for further study in structure-function relationships and elucidation of mechanism of polyketide chain release and amide formation.

In conclusion, combination of PCR screening of AHBA synthase genes with high-throughput sequencing is an efficient approach to detect the putative ansamycin gene clusters. The putative structure, inferred from PKS gene sequence, could be used to guide the isolation of new ansamycins and provide original materials for combinatorial biosynthesis.

Keywords: ansamycin; AHBA synthase; amide synthase

缩略词对照表

缩略语	英文名	中文名
AHBA	3-amino-5-hydroxybenzoic acid	3-氨基-5-羟基苯甲酸
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
AS	amide synthase	酰胺合酶
bp	base pair	碱基对
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase	小牛小肠碱性磷酸酶
CLM	Calicheamicins	刺孢霉素
CoA	Coenzyme A	辅酶 A
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
E coli	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希氏菌
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
GA	Geldanamycin	格尔德霉素
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
MRSA	Methicillin resistant staphylococcus aureus	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
MS	mass spectrometry	质谱
NATs	Arylamine N-Acetyltransferases	芳氨氮乙酰基转移酶
NTA	Ni ²⁺ -nitrilo-triacetic acid agarose	镍脒三乙酸琼脂糖
NRPS	nonribosomal peptide synthetase	非核糖体肽合成酶
ORF	open reading frame	开放阅读框
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PKS	Polyketide synthase	聚酮合酶
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TE	Thioesterase	硫酯酶
17-AAG	17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin	17-丙烯氨基-17-去甲氧基格尔德霉素
17-DMAG	17-dimethylamino-ethylamino-17-demethoxygeldanamycin	17-二甲氨基乙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素

第一章 前言

1. 小单孢菌次级代谢产物研究进展

放线菌是一类重要的微生物资源,小单孢菌属(*Micromonospora*)属于细菌域-放线菌门-放线菌纲(亚纲)-放线菌目-小单孢菌亚目-小单孢菌科。小单孢菌属中的多数种为好氧型,最适生长温度为 20℃-40℃。

1.1. 小单孢菌的分布及分离

近年来,越来越多的活性物质在小单孢菌中被发现^[1],研究小单孢菌的生态分布及小单孢菌的分离方法逐渐成为资源微生物研究的重点之一。

1.1.1. 小单孢菌的分布

小单孢菌在自然界中分布十分广泛,在植物、土壤、水生环境、低温环境、碱性环境中均有分布。在土壤中,小单孢菌的数目并不是很多,占放线菌的总数一般不超过 5%。小单孢菌在河流或湖泊沉积物中出现的频率要高于土壤^[2]。小单孢菌是海洋微生物的主导类群之一^[3],由于海洋生态环境的特殊性,分布于海洋中的小单孢菌的种类、数量、活性等存在很大差异。近几年来,人们陆续从海洋中分离到大量的小单孢菌,2005 年报道的新属 *Salinispora* 也是从海洋中分离到的。在湖底泥等生境中小单孢菌也是优势菌,数量可高达放线菌总数的 90%。

红树林属于热带海岸潮间带的木本植物群落,由于受温暖洋流的影响,有些可以分布到亚热带。红树林植物一般生活在海岸和河口潮间带,因潮汐的影响存在水陆两栖现象,具有十分独特的生理和生态特征。由于红树林生态环境的特殊性,其中蕴藏着巨大的微生物资源,小单孢菌是其中的主要类群之一。林鹏^[4]从福建九龙江口红树林土壤中分离到小单孢菌、链霉菌、链轮丝菌、红球菌、小多孢菌和游动放线菌6个属的放线菌,其中多数为小单孢菌,数量约占56.0%~90.9%。Wu等也从红树林土壤中分离到小单孢菌、链轮丝菌、链霉菌、诺卡氏菌和红球菌5个属,其中链霉菌和小单孢菌在数量上占有绝对优势^[5]。

1.1.2. 小单孢菌的分离

小单孢菌在自然界中分布广泛,但是目前分离的小单孢菌数量却不是很多。

土壤、湖海沉淀物、泥样、水、植物等都可以作为分离小单孢菌的材料。在小单孢菌的分离过程中,添加合适的选择性抑制剂和适当的土样预处理方法可以抑制细菌、真菌、链霉菌的生长,进而增加小单孢菌的出菌率^[6-8]。

海洋环境具有高压、高盐、低氧等特点,由于特殊的生存环境,海洋小单孢菌的营养需求及生长条件等都成为制约其分离的一个重要瓶颈,因而,在分离海洋小单孢菌的过程中,需要针对性的培养方法和培养条件。在海洋放线菌的两个新属 *Verrucosispora* 和 *Salinispora* 的分离筛选过程中,就运用了特殊的样品处理方法——冲压法和稀释热震法,并且在培养基中加入了无菌海水^[9],海洋放线菌在含有海水的培养基中会生长得更好。

海洋小单孢菌等稀有放线菌的分离,仍然存在诸多难题。对小单孢菌的营养需求、生理状况等进行深入的研究,并设计针对性强、效率好的选择性培养基都将有利于小单孢菌的培养,从而分离到更多的小单孢菌,从中得到更多对人类有益的活性物质。

1.2. 小单孢菌中的活性物质

链霉素被发现以后,大量的抗生素(四环素,大环内酯类,氯霉素等)从链霉菌中被分离出来。随着大量抗生素被发现,在传统放线菌中寻找新型抗生素变得越来越困难。人们开始把目光投向小单孢菌属 (*Micromonospora*)、马杜拉放线菌属 (*Actinomadura*)、游动放线菌属 (*Actinoplanes*)等稀有放线菌。有关抗生素文献的数据库 (ABL)^[10]显示,在微生物产生的天然产物中,链霉菌约占 32.1%,稀有放线菌约为 10.6%;对细菌和真菌有生理活性的微生物来源抗生素中,45.6%来自于放线菌,其中 16%由稀有放线菌产生;在放线菌目中,链霉菌产生的抗感染药物最多,其次是小单孢菌科(主要是小单孢菌属和游动单孢菌属)。到目前为止,小单孢菌不仅能产生目前已发现的链霉菌所产生的几乎全部结构类型的活性物质,而且还产生了许多自己独特的化学结构类型^[11],近年来,以找到的新抗生素数目而言,小单孢菌已经超过链霉菌而跃居首位,因此小单孢菌的次级代谢研究日益受到了人们的重视。

小单孢菌中产生的化合物结构类型多样,生物活性丰富。小单孢菌中的一些种既产抗生素又产其它的活性物质^[12, 13]。小单孢菌的次级代谢产物主要包括抗生素和酶抑制剂^[14]。其中重要的抗生素有氨基糖苷类、寡糖类抗生素、糖类

抗生素、大环内酯类抗生素、安莎类抗生素等。非抗生素的活性物质包括：异黄酮类，黑色素酶抑制剂，凝血酶抑制剂，弹性蛋白酶抑制剂等。

1987 年美国 Lederle 实验室从 Texas 州生硝和白垩土壤中分离出一株刺孢小单孢菌，从它的发酵液中分离到烯炔类抗肿瘤抗生素-刺孢霉素 (Calicheamicins, CLMs) (图 1-1)，其中 CLM γ 1¹ 的活性最高，既有广谱抗菌活性又能强效杀伤多种肿瘤细胞。自发现以来，CLMs 就以其独特的化学结构和优越的生物活性受到密切关注。近年来科研人员已经开始利用单克隆抗体免疫偶联 CLMs，从而进一步拓展了 CLMs 在临床上的应用。

Namenamicin 是从 Namenalala 岛的无脊椎动物斐济海鞘 (*Polysyncrator lithostrotum*) 和海洋微生物 (主要是小单孢菌) 共互生菌代谢产物中分离出第一个“海洋”烯二炔化合物^[15] (图 1-1)，该化合物有很强的抗肿瘤和广谱抗微生物活性。

Thiocoraline 是一种缩酚肽 (图 1-1)，分离自印度洋的一株小单孢菌，具有显著的抗肿瘤活性，显著抑制 DNA 和 RNA 的合成，已经进入临床前试验阶段^[16]。

2004 年 R. D. Charan 等从日本 Shishijima 岛分离到一株海洋小单孢菌，从中分离到一个结构新颖的生物碱 Diazepinomicin (图 1-1)，Diazepinomicin 具有很广的细胞毒活性，并具有抗菌和抗炎作用^[17]。

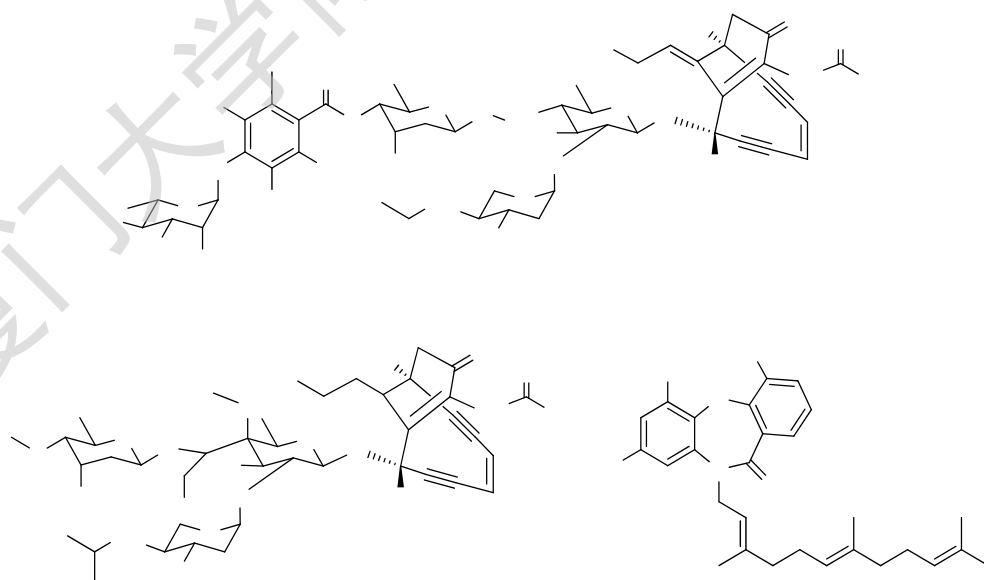


图1-1. 分离自小单孢菌属的3个代表性活性化合物

Fig. 1-1. Three Bioactive compounds isolated from *Micromonospora* sp.

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库